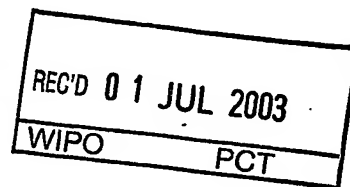


10/516987

Rec'd PCT/PTO 06 DEC 2004

PCT/EP 03/05598

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 25 117.7

Anmeldetag: 6. Juni 2002

Anmelder/Inhaber: Cognis Deutschland GmbH & Co KG, Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure

IPC: C 12 P 7/64

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. Februar 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Welhms

Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure

Gebiet der Erfindung

- Die Erfindung befindet sich auf dem Gebiet der Fettsäuren und betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure durch enzymatische Hydrolyse ihrer Ester.

Stand der Technik

- Linolsäuren mit konjugierten Doppelbindungen, die unter der Bezeichnung "CLA" (conjugated linoleic acid) im Handel sind, sind physiologisch aktiv und werden als Lebensmittelzusatzstoffe eingesetzt. Üblicherweise geht man zur Herstellung von konjugierter Linolsäure von Triglyceriden aus, die über einen hohen Anteil an - üblicherweise nicht-konjugierter - Linolsäure verfügen, wie beispielsweise Distel- oder Sonnenblumenöl. Die Triglyceride werden in Gegenwart von basischen Katalysatoren isomerisiert und gleichzeitig verseift. Von Nachteil dabei ist, dass die Verseifung zum einen eine Menge unerwünschter Abfallstoffe liefert und zudem hohe Mengen an Alkalien erforderlich sind, was rasch zu Korrosion in den Reaktoren führen kann. Um dies zu vermeiden, geht man in neuerer Zeit vorzugsweise von den Linolsäurealkylestern aus, die zunächst zu den CLA-Estern isomerisiert und dann verseift werden. Doch auch dieses Verfahren kann nicht völlig überzeugen, da es ebenfalls mit Nachteilen behaftet ist, wie z.B. geringe Ausbeuten, drastische Reaktionsbedingungen und die Bildung unerwünschter Nebenprodukte.
- Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung hat folglich darin bestanden, ein Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure zur Verfügung zu stellen, das die genannten Nachteile des Stands der Technik zuverlässig vermeidet.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure, bei dem man

- (a) konjugierte Linolsäureniedrigalkylester in Gegenwart von Enzymen mit Wasser unter kontinuierlicher Alkoholentfernung hydrolysiert,
- (b) das Hydrolysat in eine organische und eine wässrig/alkoholische Phase auftrennt, und
- (c) die die konjugierte Linolsäure enthaltende organische Phase von nicht-umgesetzten konjugierten Linolsäureniedrigalkylestern befreit.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass eine enzymatische Hydrolyse unter kontinuierlicher Alkoholabtrennung zu Fettsäuren führt, die frei von unerwünschten Nebenprodukten sind. Es werden hohe Ausbeuten erzielt, das Verfahren arbeitet bei milden Bedingungen und mit Katalysatoren, die alle Anforderungen an die Umweltverträglichkeit erfüllen. Erfolgt während des Hydrolyseverfahrens die Alkoholentfernung kontinuierlich direkt aus dem Hydrolysereaktor, erreicht man in einem Einstufenverfahren zudem eine weitaus schnellere Umsetzung.

Konjugierte Linolsäureniedrigalkylester

Als Ausgangsstoffe für das erfindungsgemäße Verfahren dienen Linolsäureniedrigalkylester, die vorzugsweise der Formel (I) folgen,



in der R^1CO für den Acylrest einer Linolsäure mit konjugierten Doppelbindungen und R^2 für einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen steht. Insbesondere werden konjugierte Linolsäuremethyl- und/oder -ethylester eingesetzt.

Enzyme

Typische Beispiele für geeignete Enzyme, die jedoch nicht einschränkend sein sollen, sind Lipasen und/oder Esterasen von Mikroorganismen die ausgewählt sind aus der Gruppe, die gebildet wird von *Alcaligenes*, *Aspergillus niger*, *Candida antarctica A*, *Candida antarctica B*, *Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizomucor miehei*, *Penicillium camen-*

berti, *Penicilium roqueforti*, *Porcine pancreas*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus* sowie deren Gemischen. Bevorzugt, weil besonders aktiv, sind Lipasen und Esterasen aus den Organismen *Alcaligenes*, *Candida*, *Chromobacterium*, *Rhizomucor*, *Pseudomonas*, *Rhizopus* und *Thermomyces*. Die Enzyme werden in der Regel als verdünnte Suspensionen oder wässrige Konzentrate eingesetzt. Die Lipasen/Esterasen können auch immobilisiert auf Trägermaterial eingesetzt und in sogenannten "repeated batches" wiederverwendet werden.

10 Hydrolyse

Die Hydrolyse der Fettsäurealkylester erfolgt vorzugsweise bei milden Temperaturen im Bereich von 20 bis 80 °C, vorzugsweise 30 bis 70 °C und besonders bevorzugt 35 bis 60 °C unter kontinuierlicher Abtrennung des niederen Alkohols, also üblicherweise von Methanol bzw. Ethanol unter vermindertem Druck, wobei die bevorzugte Temperatur durch das Aktivitätsoptimum der eingesetzten Enzyme vorgegeben wird. Als Hydrolyseverfahren eignet sich eine diskontinuierliche Fahrweise („Batch“), bei der ein konstanter Wassergehalt üblicherweise im Bereich von 30 – 70 Gew.-% im Reaktor über Nachdosierung von Wasser eingestellt wird. Üblicherweise wird die Reaktion bei einer Temperatur von 30 bis 50 °C und einem verminderten Druck von 60 ± 5 mbar durchgeführt. Als weiteres eignet sich ein Hydrolyseverfahren in ebenfalls diskontinuierlicher Fahrweise, bei der Wasser kontinuierlich eingespeist wird und dauerhaft ein Alkohol/Wasser-Gemisch entfernt („gestrippt“) wird. Üblicherweise ist der Wassergehalt im Reaktor bei dieser Fahrweise gering (0 bis 20 Gew.-%). Die Reaktion wird üblicherweise bei einer Temperatur von 50 bis 70 °C und einem verminderten Druck von 60 ± 5 mbar durchgeführt.

Aufarbeitung

Im Anschluss an die Hydrolyse wird die wässrig/alkoholische von der organischen Phase getrennt und letztere aufgearbeitet, d.h. nicht umgesetzter Alkylester vom Wertprodukt entfernt. Je nach Dauer der Hydrolyse werden unterschiedliche Spaltraten erhalten. Die Reaktion kann früh, beispielsweise schon im Bereich einer Umsetzung von 60 Gew. %, abgebrochen werden, so dass die nachfolgende Trennung von Fettsäuren und Fettsäureestern erfolgen muss. Sie kann jedoch auch erst bei über 90 Gew.-%, vorzugsweise über 95 Gew.-% beendet werden, oder sogar bis zu > 99 Gew.-% weitergeführt werden, so dass keine anschließende Abtrennung mehr notwendig ist. Die Trennung kann destillativ oder über Verseifung der freien Fettsäure und anschließender Phasenseparation erfolgen. Eine nicht destillative Trennung von

freier Fettsäure und Fettsäureestern ist zu bevorzugen. Insbesondere ist aber eine komplette Hydrolyse der konjugierten Linolsäureester (Spaltgrad > 99 %) unter milden Reaktionsbedingungen bevorzugt, um eine Veränderung der Isomerenzusammensetzung zu vermeiden.

Beispiele

Beispiel 1

Selektion geeigneter Lipasen.

5

10

15 Ansätze mit jeweils 4 g konjugiertem Linolsäureethylester und 6 g Wasser in einem verschließbaren Reaktionsgefäß wurden bei Raumtemperatur parallel auf einer Multirührplatte gerührt. Zu den Ansätzen werden jeweils 40 mg kommerziell erhältliche Lipasen bzw. Esterasen zudosiert. Nach 2 h und 22 h Reaktionszeit werden jeweils Proben genommen. Die organische Phase enthaltend Fettsäureethylester und enzymatisch hydrolysierte Fettsäure wurden separiert und analysiert. Der Umsatz wurde über die Säurezahl bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

15

Tabelle 1
Eingesetzte Lipasen und Esterasen

Enzym	Mikroorganismus	Hersteller	Säurezahl		Umsatz	
			2h	22h	2h	22h
Chirazym L-10	<i>Alcaligenes sp.</i>	Roche	21	41	11,5	20,5
Lipase A	<i>Aspergillus niger</i>	Amano	6	16	3	8
Novozym 868	<i>Candida antarctica A</i>	Novozymes	5	6	2,5	3
Novozym 525	<i>Candida antarctica B</i>	Novozymes	52	62	26	30
Lipomod 34	<i>Candida cylindracea</i>	Biocatalysts	45	61	22,5	30
Lipase LP	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Asahi Kasei	45	60	22,5	30
Novozym 388	<i>Rhizomucor miehei</i>	Novozymes	8	11	4	5,5
Lipase G	<i>Penicillium camemberti</i>	Amano	15	38	7,5	19
Lipase R	<i>Penicillium roqueforti</i>	Amano	6	6	3	3
Lipase L115P	<i>Porcine pancreas</i>	Biocatalysts	6	6	3	3
Lipase PS	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Amano	46	57	23	28,5
Lipase AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano	26	53	13	26,5
Lipomod 36 P	<i>Rhizopus javanicus</i>	Biocatalysts	21	38	11,5	19
Lipase F-AP 15	<i>Rhizopus oryzae</i>	Amano	12	18	6	9
Lipolase Tl 100	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Novozymes	38	53	19	26,5

20

Alle getesteten Lipasen und Esterasen erwiesen sich in der Hydrolyse der Fettsäureester aktiv. Bevorzugt sind jedoch Mikroorganismen vom Typ *Alcaligenes*, *Candida*, *Chromobacterium*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Rhizopus* und *Thermomyces*. Die Reaktion ohne Entfernung von Ethanol reagierte unter obigen Bedingungen bis zu einem Gleichgewicht von etwa 30 Gew.-% freier Fettsäure.

25

Beispiel 2**Kontinuierliche Hydrolyse von kurzkettigen konjugierten Linolsäuremethylestern unter Abstrippen von Wasser und Methanol.**

5

10

In einen beheizbaren Kolben wurden 400 g konjugierter Linolsäuremethylester, 200 g Wasser und 20 g auf Polypropylen immobilisierte *Candida antarctica* B Lipase vorgelegt. Die Reaktion wurde mit aufgesetzter Destillationsbrücke bei einem verminderten Druck von 60 mbar und einer Temperatur von 60 °C durchgeführt. Wasser wurde kontinuierlich mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in den Kolben gepumpt. Die Umsetzung der Reaktion wurde über Bestimmung der Säurezahl verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch vom immobilisierten Enzym abfiltriert und die organische Phase von der wässrigen Phase über Separation getrennt. Eine Säurezahl von 200 entsprach 100 % Umsatz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst:

15

Tabelle 2

Umsatz unter Abstrippen von Wasser und Methanol nach unterschiedlichen Reaktionszeiten

Reaktionszeit [h]	Säurezahl	Umsatz [%]
0	0	0
2	96,4	48,2
8	139,2	69,6
24	189,5	94,7
48	198,8	99,4

Nach Analyse der Säurezahl wurde eine konjugierte Linolsäure mit einem Spaltgrad von > 99 % innerhalb von 48 h Reaktionsdauer als klare, schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit erhalten.

25

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure, bei dem man

- (a) konjugierte Linolsäureniedrigalkylester in Gegenwart von Enzymen mit Wasser unter kontinuierlicher Alkoholentfernung hydrolysiert,
 (b) das Hydrolysat in eine organische und eine wässrig/alkoholische Phase auftrennt, und
 (c) die konjugierte Linolsäure enthaltende organische Phase von nicht-umgesetzten konjugierten Linolsäureniedrigalkylestern befreit.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass man konjugierte Linolsäureniedrigalkylester der Formel (I) einsetzt,



(I)

in der R^1CO für den Acylrest einer Linolsäure mit konjugierten Doppelbindungen und R^2 für einen linearen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen steht.

3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und/oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass man die Hydrolyse mit Lipasen und/oder Esterasen in freier oder immobilisierter Form durchführt.

4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass man Lipasen und/oder Esterasen einsetzt, die ausgewählt sind aus der Gruppe von Mikroorganismen, die gebildet wird von *Alcaligenes*, *Aspergillus niger*, *Candida antarctica A*, *Candida antarctica B*, *Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizomucor miehei*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, *Porcine pancreas*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus*.

5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass man die Hydrolyse bei Temperaturen im Bereich von 20 bis 80 °C durchführt.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass man die Hydrolyse bis zu einem Spaltgrad von 60 bis 100 Gew.-% durchführt.

7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass man während der Hydrolyse im Reaktor einen konstanten Wassergehalt im Bereich von 30 bis 70 Gew.-% im Reaktor einstellt.
- 5 8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass man während der Hydrolyse im Reaktor einen Wassergehalt im Bereich von 0 bis 20 Gew.-% einstellt.

Zusammenfassung

Vorgeschlagen wird ein Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure, bei dem man

5

- (a) konjugierte Linolsäureniedrigalkylester in Gegenwart von Enzymen mit Wasser unter kontinuierlicher Alkoholentfernung hydrolysiert,
- (b) das Hydrolysat in eine organische und eine wässrig/alkoholische Phase auftrennt, und
- (c) die die konjugierte Linolsäure enthaltende organische Phase von nicht-umgesetzten kon-

10